

Пастухов Д.М., Яковлев М.В.
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ СЛЮНЫ НА
БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ И КИНЕТИКУ РОСТА
ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH

Кафедра микробиологии и вирусологии
ФГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им.
акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Российская Федерация

Pastukhov D.M., Yakovlev M.V.
INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF SOME SALIVA
ENZYMES ON THE BIOFILM FORMING ACTIVITY AND THE GROWTH
KINETICS OF *CANDIDA* AT VARIOUS VALUES OF pH

Microbiology and Virology Department
Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University
Perm, Russian Federation

E-mail: pastuhovdanilam@gmail.com

Аннотация. В настоящем исследовании выделенные у пациентов, штаммы дрожжеподобных грибов культивировали в определенных условиях pH, при этом оценивали динамику роста при pH 5,0 и 7,0, а также при различных концентрациях лизоцима, параллельно проигрывали оценку биопленкообразующей активности штаммов. Показано отсутствие значимого эффекта лизоцима на биопленкообразование *C. albicans* в среде с pH 7,0. При снижении pH биопленкообразующая активность кандид пропорционально существенно снижается, а лизоцим в таких условиях способствует разрушению биопленки.

Abstract. In the present study, yeast-like fungal strains isolated from patients were cultured under certain pH conditions, and growth dynamics were evaluated at pH 5.0 and 7.0, as well as at various concentrations of lysozyme, and the biofilm-forming activity of the strains was evaluated in parallel. The absence of a significant effect of lysozyme on the biofilm formation of *C. albicans* in a medium with a pH of 7.0 was shown. With decreasing pH, the biofilm-forming activity of candida decreases proportionally significantly and lysozyme under such conditions contributes to the destruction of biofilms.

Ключевые слова: кандидоз, иммунитет, слюна, лизоцим, биопленки.

Key words: candidiasis, immunity, saliva, lysozyme, biofilm.

Введение

На сегодняшний день носительство грибов *Candida albicans* среди людей составляет 25%. Дрожжеподобные грибки рода *Candida* являются условно

патогенным микроорганизмом и входят в состав резидентной микрофлоры полости рта. При снижении иммунитета, например, при применении некоторых лекарственных средств, соматических заболеваниях, происходит увеличение их пролиферативной активности, что приводит к кандидозу. Заболевание имеет различные клинические проявления, наиболее частыми из них являются появление белесоватого, творожистого налета на слизистой полости рта, губ, задней стенки глотки. Кроме косметических недостатков, заболевание проявляется дискомфортом и жжением в области поражения. Чаще всего, при кандидозе полости рта, встречается вид *C. albicans* [4]. Ротовая жидкость – совокупность слюны, продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, десневой жидкости, слущенного эпителия, остатков пищи. Слюна обладает множеством функций, одна из них является защитной. Ведущую роль в реализации такой функции играет ферментный состав, например амилаза, лизоцим и другие [1].

Лизоцим (мурамидаза) – фермент, который принадлежит к классу гидролаз и обладает способностью к гидролизу β -1-4-гликозидной связи между остатками *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмураминовой кислотами пептидогликана клеточной стенки грамположительных бактерий, которые в составе клеточной стенки имеют β -1,4-гликозидной связи, а её мукопептиды связаны с тейхоевыми кислотами [3]. Компоненты клеточной стенки *C. albicans* можно отнести к факторам патогенности, так как они активно участвуют в клеточном метаболизме, а также содержат полисахариды, которые обладают антигенными свойствами. Маннанопротеины клеточной стенки грибов *Candida* играют основную роль в процессах колонизации, адгезии и инвазии. Благодаря клеточной стенке и плотной микрокапсуле грибы рода *Candida* защищены от воздействия лекарственных веществ, что в определенной степени может быть причиной недостаточной эффективности проводимой антимикотической терапии. Хитин представляет собой полимер с β -1,4-связанными остатками *N*-ацетилглюкозамина и может быть мишенью действия лизоцима. Примерно 90% этого соединения находится в области образования и отделения дочерних клеток. В латеральной клеточной стенке локализовано примерно 10% хитина [2]. В связи со сложным строением клеточной стенки дрожжеподобных грибов, влияние лизоцима на них остается не ясным.

Цель - определить влияние pH и лизоцима на кинетику роста и биопленкообразующую активность (БПА) грибов *C. albicans*.

Материалы и методы. Исследования проведены на штаммах *C. albicans*, выделенных со слизистой оболочки полости рта БПА изучали в плоскодонных планшетах по методике О'Тооле [6]. Для изучения влияния pH на БПА штаммы культивировали в бульоне Сабуро с pH 5,0; 7,0 при температуре 37°C в течении 24 часов. В аналогичных условиях в пробы вносили лизоцим в концентрации 40 мкг/мл, что соответствует концентрации лизоцима в слюне здорового человека [5] и 2 мг/мл, что значительно превышает его концентрацию в слюне.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента, при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Показано, что лизоцим оказывает влияние на кинетику роста и его действие зависит от pH среды. В среде с pH 5,0 лизоцим резко ингибирует рост *C. albicans*, что может указывать на его бактерицидное действие. При pH 7,0 лизоцим сходным образом проявляет свою бактерицидную активность, однако, в меньшей степени.

Поскольку pH ротовой жидкости здорового человека составляет 7,6, нами была изучена БПА грибков при нейтральной pH - $0,594 \pm 0,095$ у.е. В разных клинических ситуациях может происходить снижение pH слюны вплоть до 5,0. В таких условиях БПА дрожжеподобных грибков составила $0,129 \pm 0,018$ у.е. ($p > 0,05$ к БПА при pH 7,6). Ранее было показано, что в разрушении биопленок может принимать участие фермент лизоцим. Известно, о зависимости активности фермента от pH среды. В нашем исследовании показано, что при pH 5,0 лизоцим разрушает биопленку в большей степени, чем при pH 7,0 ($0,209 \pm 0,005$ и $0,284 \pm 0,014$ у.е. соответственно; $p < 0,05$).

Заключение. Показано, что влияние лизоцима на биопленкообразование дрожжеподобными грибами зависит от pH среды. При pH 5,0 биопленкообразующая активность кандид существенно снижена, а лизоцим в таких условиях способствует разрушению биопленки.

Список литературы:

1. Замбрицкий О.Н. Оценка состояния неспецифической резистентности организма по иммунологическим показателям слюны и кожи / О.Н. Замбрицкий, Ю.И. Езепчик, М.О. Герасимук // Здоровье и окружающая среда. – 2012. – № 21. – С. 73-77.
2. Калебина Т.С. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей / Т.С. Калебина, И.С. Кулаев // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 105-107.
3. Мозговая Л.А. Влияние некоторых ферментов слюны на биопленкообразующую активность условно патогенных микроорганизмов / Л.А. Мозговая, М.В. Яковлев, К.А. Батог, А.П. Годовалов // Материалы Международной научно-практической конференции «Современная стоматология: от традиций к инновациям». – Тверь, 2018. – С. 264-268.
4. Пастухов Д.М. Влияние изменения pH на динамику роста грибков рода *Candida albicans*, выделенных при воспалительных заболеваниях полости рта / Д.М. Пастухов // Материалы международной научно-практической конференции «Современная стоматология: от традиций к инновациям». – Тверь, 2018. – С. 275-279.
5. Халатов В.А. Иммунологические показатели слюны у жителей Липецкой области / В.А. Халатов, А.В. Гулин, Е.В. Невзорова // Вестник ТГУ. – 2015. – т.20, вып.2. – С. 354-356.
6. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay / G.A. O'Toole // J. Vis. Exp. – 2011. – Vol. 47. – pii: 2437.